F2RL3 基因甲基化水平在血栓性疾病中的表达

刘芸[1]　李玉洁[1]　田丰[2]　李树中[1]

［摘要］ **目的：**探讨血栓形成性疾病患者 F2R 样凝血酶/胰蛋白酶受体 3(F2RL3)基因甲基化水平，以评价 *F2RL3* 基因甲基化鉴别血栓性疾病的效能。**方法：**收集 246 例血栓性患者的 EDTA-K_2 抗凝全血标本，包括颈内静脉血栓(IJVT)37 例、下腔静脉栓塞(IVCT)49 例、下肢静脉栓塞(LEVT)32 例、心肌梗死(MI)52 例、脑梗死(CI)76 例和健康对照组(Ctrl)76 例，采用实时荧光定量 PCR 技术检测全血 *F2RL3* 基因启动子甲基化水平，并分析其与危险因素的相关性。**结果：**①246 例血栓性疾病患者全血 *F2RL3* 基因甲基化水平为(0.49±0.11)，低于 Ctrl 组(0.60±0.15)，差异有统计学意义($P<0.05$)。②静脉血栓患者(VT 组)全血 *F2RL3* 基因甲基化水平为(0.50±0.08)，动脉血栓者(AT 组) *F2RL3* 基因甲基化水平为(0.49±0.12)，均低于 Ctrl 组($P<0.05$)。③IVCT 组患者(0.48±0.08)、LEVT 组患者(0.49±0.11)和 CI 患者(0.48±0.09)F2RL3 基因甲基化水平低于 Ctrl 组，差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论：**全血 *F2RL3* 基因甲基化水平降低可辅助诊断血栓形成性疾病。

［关键词］ 血栓形成性疾病；F2RL3；甲基化
doi：10.13201/j.issn.1004-2806-b.2019.12.007
［中图分类号］ R364.1　　［文献标志码］ A

Reduced levels of *F2RL3* methylation in whole blood in thrombotic diseases

LIU Yun[1]　*LI Yujie*[1]　*TIAN Feng*[2]　*LI Shuzhong*[1]
([1]Kunshan Hospital, Jiangsu University, Kunshan, 215300, China; [2]Third People's Hospital of Kunshan City)
Corresponding author: TIAN Feng, E-mail: 983357002@qq.com

Abstract　Objective: To analyze the methylation level of *F2RL3* (coagulation factor II thrombin receptor-like 3) gene in patients with various thrombotic diseases. **Method:** EDTA-2K anticoagulated whole blood were collected of total of 246 patients with thrombotic disease, including 37 cases of internal jugular vein thrombosis(IJVT), 49 cases of inferior vena cava thrombosis(IVCT), 32 cases of lower extremity venous thrombosis(LEVT), 52 cases of myocardial infarction(MI), and 76 cases of cerebral infarction(CI) and 76 healthy controls(Ctrl). Real-time fluorescent quantitative PCR(RT-PCR) was used to detect the whole blood *F2RL3* gene promoter methylation level. **Result:** In 246 patients with thrombotic disease, the *F2RL3* gene methylation level was decreased in whole blood samples, and the methylation level of *F2RL3* gene in venous thrombosis and arterial thrombosis was decreased. **Conclusion:** The reduction of *F2RL3* methylation level in whole blood can assist in the diagnosis of thrombotic diseases.

Key words　thrombotic disease; F2RL3; methylation

血栓形成是与心肌梗死和中风等相关的动脉疾病中的关键事件，而静脉血栓形成也是癌症患者死亡的第二大主要原因，其发病率和死亡率相当高[1]。DNA 甲基化是调控基因表达和基因组稳定性的重要表观遗传机制[2]，DNA 甲基化表观遗传学作为控制基因表达的潜在机制的作用近年来在心血管疾病中也有较多的报道，尤其是在人类动脉粥样硬化斑块和过度低密度脂蛋白胆固醇合成中的报道尤为值得注意[3-5]。研究发现，*F2RL3* 基因甲基化水平参与了吸烟诱导的血管系统和血小板功能的改变，以及分娩和早产时人肌层功能的调节[4-6]。本研究旨在探讨 *F2RL3* 基因 CG03636183 位点的甲基化水平在血栓疾病中的差异性，以期为 *F2RL3* 基因甲基化作为鉴别各种血栓性疾病的诊断指标提供实验依据。

1　资料与方法

1.1　一般资料

收集 2017-07—2018-07 我院诊断为血栓性疾病的患者(Thrombus 组)246 例，男 104 例，女 142 例；年龄(56.1±16.8)岁；其中颈内静脉血栓(IJVT)37 例，下腔静脉栓塞(IVCT)49 例，下肢静脉栓塞(LEVT)32 例，心肌梗死(MI)52 例，脑梗死(CI)76 例。对照组为同期在我院体检健康者 72 例(Ctrl)，男 35 例，女 37 例；年龄(35.2±12.4)岁。所有参与者通过标准化的自填式问卷，均已签署书面知情同意书，健康相关数据均在住院康复初期获得。有关二级诊断和出院药物处方的其他信息是从医院记录中提取。

1.2　仪器与试剂

5810R 高速低温离心机购自德国 Eppendorf 公司；超净台购自上海跃进医疗器械有限公司；

[1]江苏大学附属昆山医院(江苏昆山，215300)
[2]昆山市第三人民医院
通信作者：田丰，E-mail：983357002@qq.com

Roche LightCycler 480II 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Roche 公司；OD-1000 超微量核酸检测仪购自美国 Thermo 公司；实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(iTaq Universal SYBR Green Supermix)购自美国 Bio-Rad 公司。DNA 亚硫酸盐修饰试剂盒(EZ DNA Methylation-Gold Kit)购自美国 Zymo Research 公司。血液/组织/细胞基因组提取试剂盒(DP304)购自天根生化科技(北京)有限公司)。

1.3 标本采集

采集 246 例血栓性患者入院治疗前和对照组患者 76 例清晨空腹肘静脉全血各 2 mL，于含有 EDTA-K_2 抗凝真空管里，于 4℃保存待用。

1.4 全血 DNA 提取和甲基化处理

采用用酚法，按照血液/组织/细胞基因组提取试剂盒说明书操作提取全血 DNA，用 OD-1000 超微量核酸检测仪检测 DNA 浓度和纯度，确定浓度后－20℃保存待用。取基因组 DNA 样本 800 ng，按照 EZ DNA Methylation-Gold 试剂盒说明书操作进行亚硫酸亚铁转化，在 Meth primer 网站进行甲基化引物(Methylation specific primer，MSP)和非甲基化引物(Uneethylation specific primer，MSP)的设计，并由上海生工公司合成引物。*F2RL3* 基因甲基化上游引物：5′-GGTTAGTATTTATAG(T/C)GTTAGTTTATTGGTC-3′，下游引物：5′-TATACCAATAACAATAACACCCTAAAAC-3′，产物大小为 160 bp；非甲基化上游引物：5′-GGTTAGTATTTATAG(T/C)GTTAGTTTATTGGTT-3′，下游引物：5′-TATACCAATAACAATAACACCCTAAAAC-3′，产物大小为 160 bp。采用罗氏 480 荧光定量 PCR 仪检测 F2RL3 基因甲基化水平比值。MSP 反应体系为 20 μl，其中亚硫酸盐修饰 DNA 模板 4 μl，SYBR Green Supermix 10 μl，10 μmol/L 上、下游引物各 1 μl，无核酶 ddH_2O 补足至 20 μl。反应条件：95℃ 5 min，95℃ 20 s，58℃ 30 s，72℃ 20 s，共 38 次循环，用荧光定量 PCR 仪自带软件，于 45～97 ℃检测并分析熔融曲线，97℃保存。以 SssI 甲基化酶处理的 DNA 为甲基化阳性对照。以健康成人外周血淋巴细胞 DNA 全基因组扩增为非甲基化阴性对照。甲基化程度计算公式：MSP 和 USP 的 cq 值计算甲基化程度。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计学软件进行统计学分析。临床患者基本信息构成比比较采用 χ^2 检验，2 组间比较采用 t 检验，多组间比较用单因素方差分析，所有检验均为双侧，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血栓性疾病患者全血*F2RL3* 基因甲基化水平

246 例 Thrombus 组患者全血*F2RL3* 基因甲基化水平为(0.49±0.11)，明显低于 72 例 Ctrl 组(0.60±0.15)，差异有统计学意义($t=3.77$，$P<0.05$，图 1)。进一步比较静脉血栓组(VT 组)118 例(IJVT 37 例，IVCT 49 例和 LEVT 32 例)和动脉血栓组(AT 组)128 例(MI 52 例和 CI 76 例)*F2RL3* 基因甲基化水平，结果发现 AT 组和 VT 组全血中 *F2RL3* 基因甲基化水平均低于对照组，其中 AT 组为(0.49±0.12)，VT 组为(0.50±0.08)(图 2)。

2.2 各种血栓形成性疾病患者*F2RL3* 基因甲基化水平比较

各组进行甲基化水平比较发现 I，VCT 组(0.48±0.08)、LEVT 组(0.49±0.11)和 CI 组(0.48±0.09)*F2RL3* 基因甲基化水平低于 Ctrl 组，差异有统计学意义(图 3)。

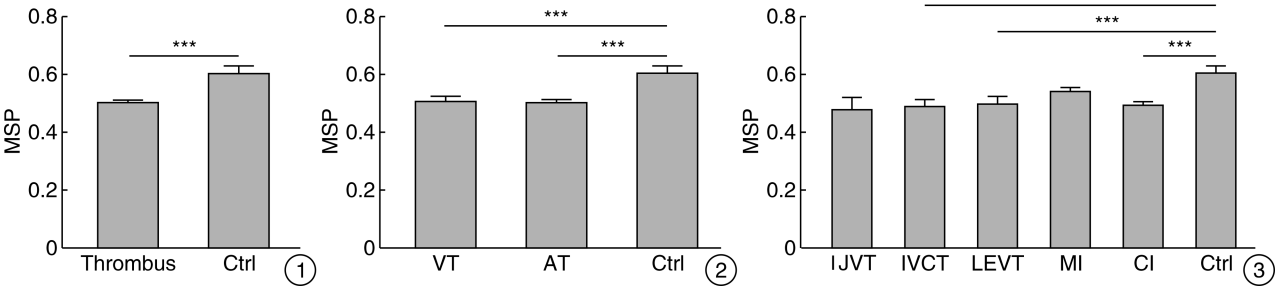

图 1 2 组*F2RL3* 基因甲基化水平比较；图 2 3 组*F2RL3* 基因甲基化水平比较；图 3 各种血栓形成性疾病患者*F2RL3* 基因甲基化水平比较

3 讨论

凝血酶是一种丝氨酸蛋白酶，在凝血级联反应中发挥着重要作用，它能够激活凝血酶原，使纤维蛋白原转化为纤维蛋白[7]，促进血栓形成。凝血酶通过激活跨膜 G 蛋白偶联蛋白酶活化受体(Protease-activated receptors，Pars)使血小板固定配基暴露，从而引起血小板聚集、释放和膜糖蛋白改变的一系列活化表现。Pars 有 4 种主要亚型(F2R、

F2RL1、F2RL2 和 F2RL3，也称为 Pars 1、2、3 和 4)，其中 F2R、F2RL2 和 F2RL3 被凝血酶激活，而 F2RL1 被胰蛋白酶激活。这些 Pars 可广泛表达于各种组织细胞中，包括血小板、血管和非血管平滑肌、成纤维细胞和内皮细胞等[8]。

凝血酶通过连接和切割血小板表面 F2RL3 激活血小板，使血小板释放二磷酸腺苷(ADP)、5-羟色胺和血栓素 A2[9]。这些激动剂又能够激活其他血小板，由此导致血栓形成信号的级联放大反应[10]。

已有研究表明，蛋白酶激活受体 4 参与多个心血管病理生理学过程，尤其是血管炎症、血小板功能和围手术期心肌损伤[11-13]。目前已确定 F2RL3 具有活化血小板和介导细胞信号传导的作用[14-15]。Lidija Covic 将抗 PAR 4 肽素注入小鼠体内，发现出血时间延长，抑制了机体血小板的活化，可作为一种潜在的药物靶点，阻断特定信号的传导通路，从而抑制血栓的形成，表面 F2RL3 在血栓形成性疾病中具有重要的临床价值[16-17]。我们的研究也发现，血栓性疾病患者的全血*F2RL3* 基因甲基化水平降低，不管是动脉血栓还是静脉血栓患者，说明*F2RL3* 基因甲基化水平与血栓形成密切相关。此外，我们对各种血栓疾病患者的全血*F2RL3* 基因甲基化水平进行了分析，发现主要是心肌梗死、下肢静脉栓塞和下腔静脉栓塞患者的*F2RL3* 基因甲基化水平降低。而血栓形成过程中血小板发挥了重要的作用，是否血小板表面的 F2RL3 受体表达改变将是我们进一步研究*F2RL3* 基因甲基化与血栓形成的方向。

有研究表明血栓性疾病具有遗传性，且具有种族差异性，因此具有家族性血栓性形成性疾病的人们尤其需要注意家族遗传，提高防护意识。以 687 位白人和 321 位非裔美国人为研究对象，用肾上腺素和二磷酸腺苷诱导血小板聚集，结果显示白人(0.36～0.42)和非裔美国人(＞0.71)中均表现出中等到极强的遗传力，而非裔美国人血浆中胶原诱导的血小板聚集的遗传力仅在非裔美国人中显著，这可能是由于某些具有遗传特性的基因改变了血小板的反应性，使其生物学性质发生改变[17]。而我们的研究并未进行家族史调查研究，今后可进行相关遗传方面的研究，以进一步阐明血栓形成性疾病的危险因素。

参考文献

[1] Vorchheimer DA, Becker R, et al. Platelets in atherothrombosis[J]. Mayo Clin Proc, 2006, 81: 59－68.

[2] Varga-Szabo D, Pleines I, Nieswandt B. Cell adhesion mechanisms in platelets [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2008, 28: 403－412.

[3] Kadan M, Doğanci S, Yildirim V, et al. In vitro effect of sodium nitrite on platelet aggregation in human platelet rich plasma--preliminary report[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19: 3935－3939.

[4] Xiao CC, Ren A, Yang J, et al. Effects of pioglitazone and glipizide on platelet function in patients with type 2 diabetes[J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2015, 19: 963－970.

[5] Jones CI, Barrett NE, Moraes LA, et al. Endogenous inhibitory mechanisms and the regulation of platelet function[J]. Methods Mol Biol, 2012, 788: 341－366.

[6] Tsai PC, Glastonbury CA, Eliot MN, et. al, Smoking induces coordinated DNA methylation and gene expression changes in adipose tissue with consequences for metabolic health[J]. Clin Epigenetics, 2018, 10: 126.

[7] Hirano K. Kanaide H. Role of protease-activated receptors in the vascular system [J]. J Atheroscler Thromb, 2003, 10: 211－225.

[8] Macfarlane SR, Seatter MJ, Kanke T, et al. Proteinase-activated receptors [J]. Pharmacol Rev, 2001, 53: 245－282.

[9] Rigg RA, Healy LD, Chu TT, et al. Protease-activated receptor 4 activity promotes platelet granule release and platelet-leukocyte interactions[J]. Platelets, 2019, 30: 126－135.

[10] Furie B, Furie BC. Mechanisms of thrombus formation [J]. N Engl J Med, 2008, 359: 938－949.

[11] McDougall JJ, Zhang C, Cellars L, et al. Triggering of proteinase-activated receptor 4 leads to joint pain and inflammation in mice[J]. Arthritis Rheum, 2009, 60: 728－737.

[12] Wu CC, Wu SY, Liao CY, et al. The roles and mechanisms of PAR4 and P2Y12/phosphatidylinositol 3-kinase pathway in maintaining thrombin-induced platelet aggregation[J]. Br J Pharmacol, 2010, 161: 643－658.

[13] Muehlschlegel JD, Perry TE, Liu KY, et al. Polymorphism in the protease-activated receptor-4 gene region associates with platelet activation and perioperative myocardial injury[J]. Am J Hematol, 2012, 87: 161－166.

[14] Etulain J, Mena HA, Negrotto S, et al. Stimulation of PAR-1 or PAR-4 promotes similar pattern of VEGF and endostatin release and pro-angiogenic responses mediated by human platelets[J]. Platelets, 2015, 26: 799－804.

[15] Chen HT, Tsou HK, Tsai CH, et al. Thrombin enhanced migration and MMPs expression of human chondrosarcoma cells involves PAR receptor signaling pathway[J]. J Cell Physiol, 2010, 223: 737－745.

[16] French SL, Arthur JF, Lee H, et. al. Inhibition of protease-activated receptor 4 impairs platelet procoagulant activity during thrombus formation in human blood[J]. J Thromb Haemost, 2016, 14: 1642－1654.

[17] Gao BF, Shen ZC, Bian WS, et al. Correlation of hypertension and F2RL3 gene methylation with Prognosis of coronary heart disease[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2018, 32: 1539－1544.

（收稿日期：2019-05-26）